



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|---|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/30, 15/86, C07K 14/44, 16/20, C12N 5/10, C12Q 1/68, C12N 7/01, A61K 39/008, 39/395, 35/70 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 95/30006 (43) Date de publication internationale: 9 novembre 1995 (09.11.95) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00529 (22) Date de dépôt international: 21 avril 1995 (21.04.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/05313 2 mai 1994 (02.05.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GLAICHENHAUS, Nicolas [FR/FR]; 88, boulevard Mantega-Righi, F-06100 Nice (FR). MOUGNEAU, Evelyne [FR/FR]; 88, boulevard Mantega-Righi, F-06100 Nice (FR). ALTARE, Frédéric [FR/FR]; 31, avenue Hector-Otto, F-98000 Monaco (FR). CALBO, Sébastien [FR/FR]; 11, rue des Arbousiers, F-34970 Maurin (FR). SOLDERA, Sylvélie [FR/FR]; Bâtiment 118, 1, place Carré, F-06560 Valbonne (FR). (74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; CNIT, Boîte postale 434, F-92053 Paris-La Défense (FR). | (81) Etats désignés: BR, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> | |
| (54) Title: LEISHMANIA MAJOR PROTEIN, NUCLEIC ACID CODING THEREFOR, AND USES THEREOF (54) Titre: PROTEINE MAJEURE DE LEISHMANIES, ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR CETTE PROTEINE ET LEURS APPLICATIONS (57) Abstract A Leishmania major protein, a nucleic acid sequence coding therefor, and the use thereof, in particular for preparing a leishmaniasis vaccine for mammals, especially humans and dogs, are disclosed. (57) Abrégé La présente invention a pour objet une protéine majeure de leishmanies ainsi que la séquence d'acide nucléique codant pour cette protéine, et l'utilisation de celle-ci notamment pour la préparation d'un vaccin contre la leishmaniose chez les mammifères et plus particulièrement chez l'homme et le chien. | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|-----------|---------------------------|-----------|---|-----------|-----------------------|
| AT | Autriche | GB | Royaume-Uni | MR | Mauritanie |
| AU | Australie | GE | Géorgie | MW | Malawi |
| BB | Barbade | GN | Guinée | NE | Niger |
| BE | Belgique | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Faso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BJ | Bénin | IT | Italie | PL | Pologne |
| BR | Brésil | JP | Japon | PT | Portugal |
| BY | Bélarus | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| CA | Canada | KG | Kirghizistan | RU | Fédération de Russie |
| CF | République centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CG | Congo | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CH | Suisse | KZ | Kazakhstan | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LK | Sri Lanka | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CS | Tchécoslovaquie | LV | Lettonie | TG | Togo |
| CZ | République tchèque | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DE | Allemagne | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| DK | Danemark | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | UZ | Ouzbékistan |
| FR | France | | | VN | Viet Nam |
| GA | Gabon | | | | |

PROTÉINE MAJEURE DE LEISHMANIES, ACIDE
NUCLÉIQUE CODANT POUR CETTE PROTÉINE ET LEURS
APPLICATIONS.

5 La présente invention concerne une nouvelle
protéine majeure de leishmanies utile pour la
préparation d'un vaccin contre les leishmanioses chez
les mammifères et plus particulièrement chez l'homme et
le chien.

10 Les leishmanioses sont des maladies
endémiques d'origine parasitaire, dont les agents
causales, les leishmanies, sont des protozoaires
flagellés appartenant à l'ordre des kinetoplastidés et à
la famille des trypanosomatidés. Un grand nombre de
15 types de leishmanies sont susceptibles d'infecter
l'homme; selon le type considéré et les facteurs
génétiques et immunologiques de l'hôte, elles sont à
l'origine de manifestations cliniques très différentes.
On distingue ainsi les leishmanioses cutanées, muco-
20 cutanées et viscérales. Certaines de ces maladies,
telles que les leishmanioses viscérales, sont fatales en
l'absence de traitement, d'autres, comme les formes
muco-cutanées, sont très défigurantes.

25 Bien qu'en pleine expansion chez l'homme
dans les régions tropicales, les leishmanioses sont
essentiellement des maladies du chien, lequel est le
principal réservoir du parasite. Dans les régions
développées, la progression de la leishmaniose canine
est liée incontestablement à l'accroissement du nombre
30 de chiens domestiques. Il n'est pas pratiqué aujourd'hui
d'abattage systématique des chiens malades ou
asymptomatiques et le traitement utilisé à base de
dérivés antimoniés s'avère d'autant plus décevant qu'une
première cure entraîne dans certains cas une guérison

apparente de l'animal qui rechute souvent quelques mois plus tard.

On sait par ailleurs que l'immunodépression liée aux virus de l'immunodéficience humaine favorise la survenue d'infections qualifiées d'opportunistes. Le parasite opportuniste vit en équilibre avec l'hôte sain et n'entraîne aucune manifestation pathologique. Il a pour caractéristique de devenir pathogène en cas d'altération des défenses immunitaires. L'incidence élevée de la leishmaniose viscérale chez les patients infectés par le VIH amène à considérer qu'il s'agit bien là d'une infection opportuniste. L'étude poussée de la leishmaniose constitue donc aujourd'hui un enjeu majeur en terme de santé publique.

Le cycle de ces parasites est relativement simple et l'on distingue deux formes, dénommées promastigote et amastigote, qui infectent des hôtes spécifiques et qui diffèrent tant par la morphologie que par le métabolisme :

- La forme promastigote, munie d'un long flagelle, se développe dans le tractus digestif de diptères hématophages vecteurs de la maladie, appelés communément phlébotomes et appartenant aux genres *Phlebotomus*, *Lutzmya* et *Psycholopygus*.

- La forme amastigote, pourvue d'un très court flagelle, se multiplie de manière quasi exclusive dans les macrophages de certains mammifères.

Ainsi, lorsqu'un phlébotome infecté pique un mammifère pour se nourrir, il lui injecte des promastigotes; ceux-ci sont rapidement phagocytés par les macrophages et se transforment en amastigotes. Après plusieurs cycles de multiplication, chaque macrophage peut contenir des dizaines de parasites. On suppose qu'à ce stade, les macrophages éclatent et libèrent les amastigotes qui peuvent propager l'infection en

colonisant des macrophages sains. Si le repas sanguin d'un phlébotome est effectué sur un mammifère infecté, il peut être contaminé par des macrophages parasités; les amastigotes ainsi captés vont alors se transformer en promastigotes dans la lumière du tube digestif des insectes, assurant la perpétuation du cycle.

Le phlébotome transmet ainsi la maladie du chien au chien et du chien à l'homme. Ce qui explique que maladies humaines et animales sont étroitement liées.

En outre, la plupart des leishmanies pathogènes pour l'homme peuvent également infester les rongeurs couramment utilisés au laboratoire, lesquels développent des pathologies souvent très proches de celles rencontrées chez l'homme et constituent donc des modèles expérimentaux adaptés pour tester le pouvoir vaccinant d'antigènes. La sensibilité aux leishmanies des différentes lignées de souris syngéniques est sous contrôle génétique et dépend essentiellement des immunités innées et acquises; ainsi les souris C57BI/6 et C3H sont résistantes à l'infection par diverses espèces de leishmanies et d'autres, telles BALB/c sont particulièrement sensibles.

Les premiers essais de vaccination chez l'homme contre la leishmaniose viscérale ou cutanée ont utilisé des souches parasites tuées par chauffage ou par irradiation; plusieurs essais cliniques ont été effectués avec différentes souches comme *Leishmania major*, *Leishmania mexicana* ou *Leishmania brasiliensis*. Les résultats des essais réalisés avec *L. Major*, en présence de BCG comme adjuvant, montrent que des quantités très importantes de parasites doivent être injectées pour obtenir des niveaux de protection suffisants (WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Progress Report 1991-1992).

Il a aussi été proposé d'utiliser des fractions polypeptidiques de leishmania présentant des propriétés immunogènes, par exemple dans les Demandes de Brevet Français publiées sous les numéros 2 615 103, 2 612 779 et 2 577 140.

Les inconvénients majeurs limitant l'utilisation de ces antigènes protecteurs pour la préparation de vaccins résident d'une part, dans les difficultés de production de ces fractions protéiques par extraction de tissus, et d'autre part, dans le risque potentiel, bien que celui-ci soit toujours minime, d'effets indésirables liés à la mise en oeuvre de produits directement issus des parasites.

Les développements de la biologie moléculaire permettent aujourd'hui de nouvelles approches de recherche et de production de protéines de leishmanies.

Ainsi, plusieurs protéines ont été récemment identifiées et testées à titre de vaccins sur des modèles de souris :

- La protéine la plus étudiée est la glycoprotéine gp63 décrite par Etges R., Bouvier J. et Bordier C. (*J. Biol. Chem.* 1986; 261:9098-9101). Le pouvoir vaccinant de cette protéine a été testé sans succès chez la souris BALB/c (Russel D.G., Alexander J.; *J. Immunol* 1988; 140:1274-1279). Le clonage de la gp63 (Button L.L., McMaster W.R., *J. Exp. Med.* 1988; 167:724-729) a permis de préparer un peptide synthétique, lequel, associé à un adjuvant approprié, a permis d'obtenir une protection significative (Jardim A., Alexander J.; *J. Exp. Med.* 1990; 172:645-648 . Russo DM., Turco S.J., Burns J.M. Jr., Reed SG.; *J. Immunol.* 1992; 148:202-207 . Russo DM., Burns JM. Jr., Carvalho EM.; *J. Immunol.* 1991; 147:3575-3580).

- Une autre glycoprotéine de surface, d'un poids moléculaire de 46 kD, a également été clonée (Lohman KL., Langer PJ., McMahon-Pratt D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:8393-8397) et testée. Cette protéine est capable de conférer chez la souris BALB/c une protection contre l'infection par le parasite (Champs J., McMahon-Pratt D.; *Infect. Immun.* 1988; 52:3272-3279).

- Un antigène de surface original a également été décrit comme susceptible de conférer une protection; il s'agit du lipophosphoglycane aussi dénommé "LPG", un glycoconjugué exprimé en abondance à la surface des promastigotes et qui joue un rôle de récepteur lors de l'invasion des macrophages (Handman E., Goding JW.; *EMBO J.* 1985; 4:329-336). L'immunisation de souris BALB/c avec l'antigène LPG dans de l'adjuvant de Freund induit une excellente protection contre l'infection par *L. Major*, apparemment selon un mécanisme "cellule T dépendant" (Mitchell GF., Handman E.; *Parasitol Today* 1985; 1:61-63 . Jardim A., Tolson DL., Turco SJ., Pearson TW., Olafson RW.; *J. Immunol.* 1991; 147:3538-3544).

- Un antigène soluble de leishmania dénommé "SLA" issu de promastigotes et injecté intrapéritonéalement avec l'adjuvant *C. parvum*, semble également protéger les souris BALB/c contre *L. Major* (Scott P., Pearce E., Natovitz P., Sher A.; *J. Immunol.* 1987; 139:221-227). La séparation de ce produit brut par HPLC a révélé une sous-fraction unique responsable de l'immunisation (Scott P., Pearce E., Natovitz P., Sher A.; *J. Immunol.* 1987; 139:3118-3125). Une protéine d'environ 10 kD a été identifiée à partir d'un clone de cellules T protecteur issu d'une souris immunisée avec cette sous-fraction (Scott P., Caspar P., Sher A.; *J. Immunol.* 1990; 144:1075-1079).

Une autre approche pour la mise au point d'un vaccin contre la leishmaniose a consisté à isoler des lignées ou des clones de lymphocytes T protecteurs à partir de souris ayant résisté à l'infection par le parasite; il a été observé que l'injection de ces clones à des souris susceptibles est capable d'induire une protection contre l'infection (Scott, P., Natowitz, P., Coffman, R., Pearce, E. & Sher, A.; *J. Exp. Med.* 1988; 168:1675-1684). L'article de Scott P. et al. cité précédemment (Scott P., Caspar P., Sher A.; *J. Immunol.* 1990; 144:1075-1079), décrit l'obtention et la caractérisation d'un tel clone, dénommé "Th9.1-2".

Il a par ailleurs été observé par Locksley R. et al. (Reiner, S., Wang, Z.-E., Hatam, F., Scott, P., Locksley, R.; *Science* 1993; 259:1457-1460) que l'infection de souris par le parasite *L. Major* provoque la prolifération d'une sous-population de lymphocytes CD4+ porteurs d'un récepteur particulier qui utilise les régions V β 4 et V α 8; ces auteurs ont montré que c'est cette même sous-population de lymphocytes qui prolifère chez les souris susceptibles et chez les souris résistantes suggérant ainsi que le même antigène parasitaire constitue la cible principale des lymphocytes T chez les deux types de souris; ils ont par ailleurs montré que le clone de lymphocyte T Th9.1-2 utilise également les régions V β 4 et V α 8.

D'un point de vue purement académique, ce sont les réponses immunitaires se développant aux cours d'infections murines dues à *L. Major* qui ont été le plus étudiées. Ces travaux montrent que les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle fondamental dans la résolution mais aussi dans l'aggravation des lésions (Titus, R., Ceredig, R., Cerottini, J.-C., Louis, J.; *J. Immunol.* 1985, 135:2108-2114). Tant chez les souris résistantes que susceptibles, on note respectivement une expression

préférentielle de lymphocytes T CD4+ TH1 et TH2. Les expériences réalisées sur la souris BALB/c, très sensible à *L. major*, ont permis de confirmer les corrélations entre :

- 5 - le phénotype résistant et la réponse lymphocytaire de type TH1, et,
 - le phénotype susceptible et la réponse lymphocytaire de type TH2.

10 Les lymphocytes T CD4+ TH1 et TH2 sont caractérisés par le panel de lymphokines qu'ils sécrètent, et c'est précisément par le biais de ces lymphokines que les différents types de lymphocytes T CD4+ limitent ou favorisent l'infection par le parasite.

15 Les lymphocytes TH1 produisent de l'interleukine-2 et de l'interféron γ , lequel active les macrophages et les rend leishmanicides (Locksley, R. M. and P. Scott.; *Immunology Today*, 1991; 58-61).

20 Les lymphocytes TH2 produisent de l'interleukine-4 ou de l'interleukine-10, qui peuvent d'une part, bloquer l'activation des macrophages par l'interféron γ , et d'autre part, inhibent la production des lymphokines synthétisées par les lymphocytes TH1 (Locksley, R. M. and P. Scott.; *Immunology Today*, 1991; 58-61).

25 Si la présence de ces lymphokines semble une condition nécessaire au développement d'un phénotype donné, elle n'est pas suffisante puisque le traitement de souris génétiquement résistantes ou sensibles avec respectivement de l'interleukine-4 ou de l'interféron γ
30 n'a pas d'effet à long terme sur des lésions. Cependant, l'injection d'interleukine-4 à des souris résistantes infectées induit une réponse transitoire de type TH2 et l'injection d'interféron γ à des souris sensibles infectées provoque la synthèse d'interféron γ endogène et

diminue la production d'interleukines 4 et 5 (Locksley, R. M. and P. Scott.; *Immunology Today*, 1991; 58-61).

Par ailleurs, des études récentes ont montré que l'interleukine 12 (IL-12) jouait un rôle déterminant dans le développement des lymphocytes T de type Th1 (Hsieh, C.-S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A. & Murphy, K.M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993; 89: 6065). En fait, l'administration d'IL-12 recombinante à des souris susceptibles de la souche BALB/c provoque la guérison de ces animaux lorsqu'ils sont infectés par le parasite *Leishmania major* (Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E., Gately, M.K.; *J. Exp. Med.*, 1993; 177:1505). De plus, la neutralisation de l'IL-12 conduit à un développement de la maladie chez des souris génétiquement résistantes à l'infection par ce parasite (Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E.H., Subramanayam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., Schaub, R.G; *J. Exp. Med.*, 1993; 177:1797). Cet effet peut être la conséquence indirecte de l'induction d'interféron γ et peut être régulé négativement par IL-10 (Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E., Gately, M.K.; *J. Exp. Med.*, 1993; 177:1505).

On sait en outre que l'activation des lymphocytes T CD4+ nécessite l'intervention de cellules accessoires capables de présenter des antigènes parasitaires dans le contexte de molécule de classe II spécifiées par le complexe majeur d'histocompatibilité. En effet, les antigènes protéiques ne sont pas reconnus sous leur forme native par les lymphocytes CD4+, mais requièrent un traitement préalable consistant le plus souvent en une protéolyse ménagée génératrice de peptides immunogènes capables de se lier aux molécules de classe II (*Fundamental Immunology*, third edition, Raven Press, 1993).

Les cellules présentatrices d'antigènes qui sont impliquées dans le développement des lymphocytes T CD4+ spécifiques de leishmanies n'ont pas encore été caractérisées, mais plusieurs candidats sont envisagés, tels que les lymphocytes B, les macrophages infectés ou non infectés (Prina, E., C. Jouanne, S. D. S. Lao, A. Szabo, J. G. Guillet and J. C. Antoine.; *J. Immunol.*, 1993; 151:2050-2061). Les macrophages jouent en effet un rôle ambivalent dans les processus liés à l'infection par les leishmanies; ils représentent à la fois les cellules hôtes indispensables à la croissance des parasites et les cellules qui, une fois activées, vont développer des mécanismes leishmanicides (Locksley, R. M. and P. Scott.; *Immunology Today*, 1991; 58-61)

Les Inventeurs ont mis à profit l'ensemble des connaissances académiques précédentes pour entreprendre une stratégie de recherche efficace permettant d'identifier de nouvelles protéines du parasite *L. Major*, utiles pour la préparation d'un vaccin contre différentes souches du parasite *Leishmania* chez l'homme et l'animal.

La stratégie suivante a été mis en oeuvre :

- Il a tout d'abord s'agit d'identifier un antigène de *L. Major* reconnu par le clone Th9.1-2.; pour ce faire une technique de clonage par expression a été utilisée. Cette technique a consisté à construire une banque d'ADN complémentaire du parasite *L. Major* dans un vecteur procaryote, à exprimer les protéines recombinantes dans la bactérie et à purifier lesdites protéines sur des colonnes d'affinité; puis, les protéines recombinantes ainsi obtenues, ont été testées pour leur capacité à induire la sécrétion d'interleukine-2 par les cellules d'un hybridome, dénommé ci-après LMR16.2, préparé à partir du clone T protecteur TH9.1-2. Parmi les 50 lots de 5000 clones qui

ont ainsi été fabriqués et testés, les Inventeurs ont identifié un clone exprimant une protéine recombinante de 24 Kd qui sera dénommée dans ce qui suit "protéine p24".

5 - Dans un second temps, le plasmide dont est porteur le clone correspondant à la protéine p24 a été étudié, et un insert de 582 paires de bases a été identifié. Les Inventeurs ont observé que cet insert s'hybride dans des conditions de forte stringence avec
10 deux espèces d'ARN messagers de la forme promastigote de *L. Major* de 1500 et 1800 nucléotides. La taille de cet insert étant inférieure à celles des ARNm correspondant, les Inventeurs ont cloné l'ADN complémentaire complet correspondant à la protéine p24. Il a été ainsi
15 caractérisé un acide nucléique de 1070 paires de bases comprenant une séquence de 936 nucléotides codant pour une protéine de 312 acides aminés et d'un poids moléculaire de 35 Kd qui sera dénommée dans ce qui suit "protéine p35".

20 Des expériences d'hybridation moléculaires en conditions stringentes ont également montré que des ARN messagers homologues étaient présents chez d'autres souches du parasite *Leishmania* (*L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*,
25 *L. panamensis*, *L. tropica*, *L. mexicana*). On connaît en effet un grand nombre de types de leishmanies, mais il a été montré, par exemple dans la Demande de Brevet Européen publiée sous le numéro 197 062, que les différentes espèces de leishmanies possédaient des
30 déterminants antigéniques communs induisant la protection d'anticorps neutralisants et donc susceptibles d'être utilisés dans la vaccination contre les différentes espèces de parasites.

35 La présente invention a donc pour support l'identification d'une nouvelle protéine majeure de

leishmanies utile principalement pour la préparation d'un vaccin contre la leishmaniose chez les mammifères, et plus particulièrement chez l'homme et le chien.

C'est pourquoi, l'invention a tout d'abord pour objet, une protéine comprenant la séquence de 312 acides aminés représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci dès lors qu'elle est reconnue par des anticorps anti-p35. De tels anticorps sont présents chez les animaux infectés par le parasite *L. Major*, mais peuvent aussi être préparés au laboratoire.

Les techniques permettant la préparation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre la protéine p35 ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci sont bien connues de l'homme du métier.

Les anticorps polyclonaux sont préparés par immunisation en injectant à un animal, par exemple un lapin ou une souris, une quantité appropriée de la protéine p35 préparée soit par extraction et purification de matériel biologique de *L. Major*, soit par synthèse chimique de la séquence de 312 acides aminés représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, soit encore par expression de l'ADN codant pour la protéine p35 dans un hôte.

Les anticorps monoclonaux sont produits par tout hybridome préparé selon les méthodes de fusion cellulaire entre des cellules spléniques, activées *in vitro* par la protéine p35 ou provenant d'un animal immunisé contre ladite protéine, et des cellules d'une lignée de cellules myélomateuses.

Ces anticorps, ainsi que ceux préparés à partir d'un fragment de la protéine p35 seule ou associée à une molécule porteuse sont utiles pour le dépistage immunologique *in vitro* d'une leishmaniose, et font donc également partie de l'invention.

La protéine de l'invention peut être aussi un fragment polypeptidique ou peptidique de la séquence en acides aminés représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe. Il s'agit alors de fragments représentant plus de 10 acides aminés consécutifs de ladite séquence. L'invention englobe, également les protéines, polypeptides et peptides modifiés ne se distinguant des précédents que par substitutions et/ou addition et/ou suppression de un ou plusieurs acides aminés, dès lors qu'ils conservent au moins 40 % d'homologie avec la séquence dont ils dérivent.

Une protéine particulière selon l'invention comprend la partie N terminale de la séquence de la protéine p35 représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe. A titre spécifique, on peut citer la protéine p24 dont la séquence est délimitée par les acides aminés situés aux positions 143 et 312 dans la SEQ ID NO:1. Comme indiqué précédemment, l'invention concerne aussi les peptides représentant plus de 10 acides aminés consécutifs de ladite séquence et notamment ceux recouvrant la séquence de la protéine p24. Les Inventeurs ont identifié parmi ceux-ci, un peptide de 18 acides aminés délimités par les acides aminés situés aux positions 156 et 173 dans la SEQ ID NO:1 et portant l'épitope reconnu par l'hybridome LMR16.2 et par le clone Th9.1-2; ce peptide répond à la formule suivante :

Ile Cys Phe Ser Pro Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp.

L'invention concerne aussi un conjugué présentant des propriétés antigéniques, constitué par une protéine conforme à l'invention couplée, par exemple par covalence, à une molécule porteuse telle que la sérum albumine.

Une protéine conforme à l'invention peut être préparée par synthèse chimique ou peut être produite par génie génétique dans différentes cellules hôtes selon la technique des ADN recombinants.

5 La synthèse chimique consiste par exemple à condenser plusieurs fragments préalablement formés par couplages successifs des différents acides aminés, en prenant soin de protéger toutes les fonctions réactives portées par les acides aminés exceptées les fonctions
10 amine et carboxylique engagées dans la liaison peptidique formée lors de la condensation.

 La présente invention s'intéresse plus particulièrement à la synthèse dirigée par l'acide nucléique codant pour la protéine p35 ou une forme
15 modifiée ou une partie de celle-ci.

 C'est pourquoi, l'invention a également pour objet un acide nucléique codant pour la protéine p35 ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci.

 Un acide nucléique selon l'invention
20 comprend la séquence nucléotidique représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, ou une forme modifiée ou une partie de celles-ci dès lors qu'elle est capable de s'hybrider avec ladite séquence ou avec son complémentaire.

25 L'invention concerne en effet tout fragment de l'acide nucléique représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, ou tout acide nucléique ne se distinguant des précédents que par des substitutions et/ou addition et/ou suppression de un ou
30 plusieurs nucléotides, du fait notamment de la dégénérescence du code génétique, dès lors que ces acides nucléiques peuvent s'hybrider avec la séquence nucléotidique représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, dans les conditions de
35 stringence définies ci-après :

- traitement de pré-hybridation du support sur lequel on fixe l'acide nucléique représenté dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, à 42°C, pendant 120 minutes avec une solution de pré-hybridation constituée de : formamide 50%, NaCl 900 mM, Na Citrate 90 mM, SDS 1%, ADN de thymus de veau 100 µg/ml, solution de Denhart 5X;

- hybridation avec l'acide nucléique complémentaire pendant 18 heures à 42°C dans une solution constituée de : formamide 50 %, NaCl 900 mM, Na Citrate 90 mM, SDS 1 %, ADN de thymus de veau 100 µg/ml, solution de Denhart 5X, sulfate de dextran 40%;

- 3 lavages de 30 minutes à 42°C avec une solution constituée de : NaCl 300 mM, NaCitrate 30 mM, SDS 0,1%.

Parmi les fragments d'acide nucléiques définies ci-dessus, l'invention concerne tout particulièrement ceux constituant des sondes moléculaires ou ceux comprenant environ 10 paires de base et constituant des amorces oligonucléotidiques utiles à une réaction de polymérisation en chaîne. Ces sondes et ces amorces constituent des outils avec lesquels l'homme du métier est à même de cloner des séquences nucléotidiques homologues chez différentes souches du parasite *Leishmania* qui entre dans le cadre de la présente invention.

La séquence nucléotidique représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe comporte une région 5' non codante de 71 nucléotides. Le codon ATG situé aux positions 72, 73, 74 ouvre un cadre de lecture de 936 nucléotides. Le codon stop TAA situés aux positions 1008, 1009, 1010 est suivi d'une région 3' non codante de 63 nucléotides.

La séquence d'un acide nucléique conforme à l'invention comprend la séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 72 et 1010 de la séquence nucléotidique représentée dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, codant pour la protéine p35 de 312 acides aminés. La séquence d'ADN délimitée par les nucléotides situés aux positions 498 et 1010, code pour la protéine p24 correspondant à la partie N terminale de la protéine p35.

L'invention a aussi pour objet tout acide nucléique recombinant qui comprend au moins un acide nucléique codant pour tout ou partie de la protéine p35, associé avec un promoteur et/ou un terminateur de transcription reconnu par les enzymes de la cellule hôte dans laquelle ledit acide nucléique recombinant est introduit. Avantageusement l'acide nucléique recombinant selon l'invention est introduit dans une cellule hôte au moyen de vecteurs; le vecteur ainsi que les signaux de contrôle de l'expression de l'acide nucléique recombinant sont choisis en fonction de la cellule hôte, eucaryote ou procaryote, dans lequel il est placé. Le vecteur peut être un plasmide mais aussi un vecteur viral capable d'infecter la cellule hôte. Les techniques permettant le clonage et l'expression d'un acide nucléique recombinant dans différentes cellules hôtes sont connues de l'homme du métier; elles seront illustrées dans la description des exemples qui suit, étant entendu que d'autres vecteurs et cellules hôtes peuvent être utilisés.

L'invention concerne donc également les cellules eucaryotes ou procaryotes transformées contenant au moins un acide nucléique recombinant décrit ci-dessus. Ces cellules transformées sont utiles pour la production d'une protéine selon l'invention. Ces techniques de recombinaison et de transformation

permettent la production desdites protéines incomplètes ou fusionnées à d'autres protéines afin de favoriser une meilleure expression ou une excrétion desdites protéines hors de la cellule hôte.

5 L'invention concerne plus particulièrement les virus recombinants vivants, avantageusement inactivés, tels que les virus de la vaccine, les baculovirus, utiles pour la préparation de compositions vaccinales.

10 L'invention concerne aussi une méthode de dépistage *in vitro* d'une infection par un parasite responsable de la leishmaniose dans un prélèvement biologique. Une telle méthode peut être réalisée grâce à la protéine de l'invention, ou un anticorps dirigé
15 contre cette protéine, ou encore à l'aide des sondes décrites précédemment.

La méthode de dépistage *in vitro* mettant en oeuvre des anticorps, préférentiellement monoclonaux, comprend les étapes suivantes :

20 - la mise en contact d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine p35 ou un fragment de cette protéine conforme à l'invention, avec un prélèvement biologique d'un sujet susceptible d'être infecté par un parasite responsable de leishmaniose,
25 dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre ledit anticorps et les protéines antigéniques contenus dans le prélèvement;

- la détection dudit complexe par tout moyen approprié connu de l'homme du métier.

30 Avantageusement les anticorps mis en oeuvre dans cette méthode sont marqués, par exemple de manière radioactive ou au moyen de réactif enzymatique.

Des variantes ou perfectionnements de la méthode précédente sont bien connus de l'homme du
35 métier; il s'agit par exemple de la méthode ELISA, de la

détection des complexes immunologiques à l'aide d'immunoglobulines marquées, de techniques immunoenzymatiques par compétition, ou encore de l'utilisation de plusieurs anticorps dont un au moins est spécifique de tout ou partie de la protéine p35.

Le prélèvement biologique sur lequel est réalisé le dépistage selon l'invention est préférentiellement le sang.

L'invention a en conséquence pour objet les trousse de diagnostic pour la mise en oeuvre du procédé précédent. A titre d'exemple, une telle trousse comprend notamment :

- une quantité déterminée d'un anticorps conforme à l'invention,

- un milieu approprié à la formation de complexes immunologiques entre les protéines antigéniques contenues dans le prélèvement analysé et ledit anticorps,

- des réactifs permettant la détection des complexes éventuellement formés,

- éventuellement des échantillons témoins.

Le dépistage *in vitro* d'une infection par un parasite responsable de la leishmaniose, selon une technique immunologique, peut aussi être réalisée à l'aide d'un agent de diagnostic constitué d'une ou plusieurs protéines de l'invention, d'un conjugué ou d'une composition antigénique conformes à l'invention.

Selon ce mode de réalisation, on met en contact l'agent de diagnostic défini ci-dessus, avec un prélèvement biologique, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre ledit agent de diagnostic et les anticorps anti-p35 éventuellement présents dans le prélèvement analysé, puis l'on révèle l'éventuel complexe par tout moyen approprié connu de l'homme du métier.

L'invention concerne donc aussi les compositions antigéniques précédentes ainsi que les troussees pour le dépistage d'une infection par le parasite responsable de la leishmaniose, mettant en oeuvre ladite composition ou une protéine ou conjugué de l'invention, selon le procédé décrit ci-dessus. A titre d'exemple, une telle trousse comprend notamment :

- une quantité déterminée d'au moins une protéine selon l'invention ou d'un conjugué ou d'une composition antigénique conforme à l'invention,

- un milieu approprié à la formation de complexes immunologiques entre les anticorps contenus dans le prélèvement analysé et ladite composition antigénique,

- des réactifs permettant la détection des complexes éventuellement formés,

- éventuellement des échantillons témoins.

Outre le dépistage d'une infection par un parasite responsable de la leishmaniose, le but essentiel de l'invention est de permettre la conception et la fabrication de compositions vaccinales efficaces tant chez l'homme que l'animal contre les différentes espèces de leishmanies.

Ce but est atteint grâce à des compositions pharmaceutiques utiles comme vaccins chez l'homme ou l'animal contre la leishmaniose, caractérisées en ce qu'elles comportent à titre d'agent actif au moins une protéine selon l'invention éventuellement dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention concerne plus particulièrement des vaccins vivants, caractérisés en ce qu'ils contiennent des micro-organismes recombinants vivants, tels que des virus et des bactéries, qui expriment une protéine de l'invention, éventuellement présentés dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Parmi, lesdits micro-organismes recombinants vivants, l'invention envisage à titre spécifique un virus de la vaccinne recombinant vivant et le Bacille de Calmette Guérin (BCG).

5 Les compositions vaccinales selon l'invention pourront comprendre outre l'agent actif conforme à l'invention un autre constituant actif capable de renforcer la protection induite par ledit agent actif de l'invention. On peut citer comme exemples
10 de tels constituants actifs accessoire l'Adjuvant de Freund Complet, l'Adjuvant de Freund Incomplet, le RIBI, l'interleukine 12 recombinante, des bactéries de la souche *Corynebacterium parvum*.

Ces vaccins sont sous forme administrable
15 par exemple par injection et dans ce cas le véhicule pharmaceutiquement acceptable est aqueux.

Le processus de vaccination ainsi que les doses d'agent actif devront être adaptés au type de vaccin utilisé ainsi qu'au mammifère auquel il est
20 administré.

D'autres avantages et caractéristique de l'invention apparaîtront au cours de la description qui suit et qui se réfère à des exemples notamment de clonage de l'acide nucléique codant pour la protéine
25 p35, étant entendu que ces exemples ne sauraient constituer une limitation quelconque de l'objet de l'invention.

I - Principe de la stratégie utilisée.

30 L'identification d'un antigène majeur du parasite *L. Major*, a été réalisée selon une méthode de clonage par expression utilisant la construction dans un vecteur procaryote d'une banque d'ADN complémentaire de
35 parasite, l'expression des protéines recombinantes dans

la bactérie et leur purification sur des colonnes d'affinité.

Ces protéines recombinantes ont ensuite été testées pour leur capacité à induire la sécrétion d'interleukine-2 par les cellules d'un hybridome LMR16.2 obtenu à partir du clone T protecteur Th9.1-2.

1) Description du clone T protecteur Th9.1-2

Le clone Th9.1-2 a été isolé à partir d'une lignée cellulaire qui a été elle-même préparée à partir de souris de la souche BALB/c immunisées avec des parasites inactivés. Ce clone réagit avec une fraction protéique préparée à partir de promastigotes du parasite *Leishmania major* et avec des extraits solubles des parasites *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis* et *Leishmania amazonensis*. En outre, l'injection des cellules de ce clone à des souris de la souche BALB/c protège ces souris de l'infection par le parasite *Leishmania major* (Scott, P., Caspar, P., Sher, A., J. Immunol. 1990, vol. 44, pages 1075-1079).

2) Description de l'hybridome LMR16.2.

Cet hybridome a été obtenu en fusionnant des cellules du clone Th9.1-2 avec des cellules de lymphome mutantes, cellules BW5147 α - β - (Coligan, J.E., Kruisbeek, A., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Strober, W., *Currents Protocols in Immunology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience), déficientes pour l'expression du récepteur T.

Comme les cellules du clone Th9.1-2, les cellules de l'hybridome LMR16.2 utilisent les régions V β 4 et V α 8 du récepteur T. En outre, ces cellules LMR16.2 secrètent de l'interleukine-2 en présence d'extraits bruts de parasite *Leishmania major* et de

cellules présentatrices (cellules de rate) préparées à partir de souris BALB/c.

5 **II - production des protéines recombinautes.**

 Une banque d'ADN complémentaire a été construite en utilisant comme source d'ARN des promastigotes du parasite *Leishmania major*.

10 De l'ARN total a été préparé à partir de promastigotes métacycliques et utilisé pour la préparation d'ARN polyA⁺. Le vecteur utilisé pour la construction de la banque est un dérivé du vecteur pET3a (commercialisé par la société NOVAGEN) qui a été modifié
15 de manière à introduire en aval du codon d'initiation de la traduction une séquence nucléotidique codant pour 6 résidus histidine consécutifs.

 Une banque d'environ 10⁶ clones a été obtenue et ces clones ont été regroupés en lots de 5000.

20 Les bactéries correspondantes ont été congelées et des fractions aliquotes utilisées pour la production de protéines recombinantes.

 Ces protéines ont été produites après infection des bactéries par le bactériophage CE6
25 (commercialisé par la société NOVAGEN) selon un protocole recommandé par le constructeur.

 Les protéines recombinantes ont été purifiées sur des colonnes d'affinité (résine Ni-NTA commercialisée par la société QUIAGEN) selon un
30 protocole recommandé par le constructeur, puis dialysées extensivement contre du milieu de culture (DMEM) selon un protocole classiquement utilisé (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seideman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., *Currents Protocols in Molecular Biology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).
35

III - Identification des clones positifs.

Des cellules de l'hybridome LMR16.2 ont été
5 utilisées comme sondes pour le criblage proprement dit
de la banque,

Le criblage a été effectué en incubant les
échantillons contenant les protéines recombinantes
(50 µl) pendant 24 heures dans les puits d'une plaque de
10 microtitration de 96 puits (commercialisé par la Société
COSTAR) avec des cellules de rate préparées à partir
souris BALB/c (10^6 cellules par puit) et les cellules de
l'hybridome LMR16.2 (10^5 cellules par puit) dans un
volume total de 200 µl.

15 Les lots de clones positifs ont été
identifiés en mesurant la présence d'interleukine-2 dans
les surnageants de culture en utilisant des cellules
indicatrices CTLL-2 (Coligan, J.E., Kruisbeek, A.,
Margulies, D.H., Shevach, E.M., Srober, W., *Currents*
20 *Protocols in Immunology* 1993, Greene, Editions Wiley -
Interscience) dépendantes de l'interleukine-2 pour leur
croissance.

Les préparations de suspensions
cellulaires, la mise en culture des cellules, la méthode
25 de dosage de l'interleukine-2 sont des techniques
classiquement utilisées (Coligan, J.E., Kruisbeek, A.,
Margulies, D.H., Shevach, E.M., Srober, W., *Currents*
Protocols in Immunology 1993, Greene, Editions Wiley -
Interscience).

30

IV - Caractérisation d'un clone positif.

Le criblage de 50 lots de 5000 clones a
35 permis d'identifier un clone, dénommé 23.12.10.33,

exprimant une protéine recombinante de 24 kilodaltons (protéine p24).

Cette protéine recombinante produite après induction du clone 23.12.10.33 par infection avec le bactériophage CE6, et purifiée sur des colonnes d'affinité en billes de Nickel-agarose, induit la sécrétion d'interleukine-2 par les cellules de l'hybridome LMR16.2.

La figure 1 en annexe représente la production d'interleukine-2, exprimée en unité arbitraires OD (560 nm), par les cellules de l'hybridome LMR16.2 après incubation pendant 24 heures avec des cellules de rate de la souris BALB/c et des quantités variables de protéine p24 (p24) ou d'extraits bruts (LmAg) préparés à partir de promastigotes du parasite *Leishmania major*. La préparation des surnageants cellulaires et la méthode de dosage de l'interleukine-2 sont celles classiquement utilisées (Coligan, J.E., Kruisbeek, A., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Srober, W., *Currents Protocols in Immunology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).

En outre, la protéine p24 induit la production d'interféron γ par les cellules du clone Th9.1-2.

La figure 2 en annexe représente la production d'interféron γ , exprimée en unités par ml, par les cellules du clone Th9.1-2 après incubation pendant 24 heures avec des cellules de rate de souris de la souche BALB/c et des quantités variables de protéine p24 (rec.prot.) ou d'extraits bruts (LmAg) préparés à partir de promastigotes du parasite *Leishmania major*. La préparation des surnageants cellulaires et la méthode de dosage de l'interféron γ sont celles classiquement utilisées (Coligan, J.E., Kruisbeek, A., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Srober,

W., *Currents Protocols in Immunology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).

5 V - Identification de l'épitope
reconnu par l'hybridome LMR16.2 et par le clone
TH9.1-2.

10 Afin d'identifier le peptide antigénique avec lequel réagit l'hybridome LMR16.2, des peptides recouvrants de 18 acides aminés ont été synthétisés à partir de la séquence de la protéine p24.

15 Ces peptides ont ensuite été incubés avec les cellules de l'hybridome LMR16.2 et des cellules de rate préparées à partir de souris BALB/c. Après 24 heures d'incubation, les surnageants de culture ont été récoltés et testés pour la présence d'interleukine-2.

20 Ces expériences ont permis d'identifier un peptide de 18 acides aminés qui stimule la sécrétion d'interleukine-2 et qui est également capable de stimuler les cellules du clone Th9.1-2 pour la sécrétion d'interféron γ .

25 Ce peptide de 18 acides aminés est délimité par les acides aminés situés aux positions 156 et 173 dans la SEQ ID NO:1 et répond à la formule suivante :
Ile Cys Phe Ser Pro Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser
Gly Ser Trp Asp.

30 VI - L'ARN messager correspondant à la
protéine recombinante p24 est fortement conservé
entre différentes souches de parasite *Leishmania*
major.

Le plasmide dont est porteur le clone 23.12.10.33 contient un insert de 582 paires de bases

cloné entre les sites EcoR1 et HindIII du vecteur pET3a-d9 et dont la séquence a été déterminée.

5 La séquence nucléotidique de cet insert est représentée à la figure 3. Cette séquence contient une phase de lecture correspondant à une protéine d'un poids moléculaire de 24 kilodaltons (216 acides aminés) se décomposant en une séquence leader de 5 kilodaltons (45 acides aminés) codée par le vecteur (séquence soulignée dans la figure 3) et une séquence de 19 kilodaltons (171
10 acides aminés) correspondant à la phase ouverte de l'ADN complémentaire.

L'insert du clone 23.12.10.33 hybride avec deux espèces d'ARN messagers de la forme promastigotes du parasite *Leishmania major* de 1300 et 1800
15 nucléotides dans des conditions de fortes stringences.

Des expériences d'hybridation moléculaire en conditions stringentes ont également montré que des ARN messagers homologues étaient présents chez d'autres souches du parasite *Leishmania* (*L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*,
20 *L. panamensis*, *L. tropica*, *L. mexicana*). La figure 5 représente une autoradiographie obtenue après hybridation d'une sonde moléculaire radioactivement marquée préparée à partir de l'acide nucléique correspondant à la SEQ ID NO:1 avec des ARN totaux préparés à partir de promastigotes de différentes souches de *Leishmania* (10 µg par piste), dans les conditions de stringences suivantes : 6 X SSC, 50% formamide, 42°C. Les techniques utilisées pour la
25 préparation des ARN, la séparation de ces ARN par électrophorèse en gel d'agarose et l'hybridation avec une sonde moléculaire sont celles classiquement utilisées (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D, Seideman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.,
30

Currents Protocols in Molecular Biology 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).

VII - Obtention d'un ADN
5 complémentaire complet correspondant à la
protéine p24.

La taille de l'insert du clone 23.12.10.33
étant inférieure à celles des ARN messagers
10 correspondants, un ADN complémentaire complet
correspondant à cette protéine a été cloné.

Pour cela, il a été exploité une particularité des ARN messagers du parasite *Leishmania* qui est de posséder à leur extrémité 5' une séquence leader de quelques dizaines de nucléotides.

De l'ARN polyA⁺ de promastigotes du parasite *Leishmania major* a été préparé et utilisé comme matrice pour synthétiser de l'ADN complémentaire en présence de l'enzyme transcriptase réverse commercialisé par la Société BRL et d'une amorce oligonucléotidique oligo-dT 12-18 commercialisé par la Société PHARMACIA. Le protocole de synthèse de cet ADN complémentaire est celui classiquement utilisé (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D, Seideman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., *Currents Protocols in Molecular Biology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).

L'ADN complémentaire obtenu a ensuite été amplifié en utilisant la technique de la réaction de polymérisation en chaîne en présence de deux amorces nucléotidiques :

- LM8 (5'ATTACTCGGCGTCGGAGAT3')
- LM9 (5'AACTAACGCTATATAAGTATCAG3')

correspondant respectivement à une séquence localisée
dans la région 3' de l'insert du clone 23.12.10.33 (LM8)
35 et à la séquence leader des ARN messagers du parasite

Leishmania major (LM9). Les conditions de la réaction sont celles préconisées par le fournisseurs de l'enzyme TAQ polymérase. Trente cycles ont été effectués (1 minute à 94°C, 2 minutes à 55°C et 3 minutes à 72°C).

5 Un fragment d'ADN de 1070 paires de bases a ainsi été obtenu et sous cloné entre les sites EcoR1 et Sma1 du vecteur Bluescript commercialisé par la Société STRATAGENE.

10 La séquence nucléotidique de cet insert a été déterminée et la séquence polypeptidique correspondante a été déduite de la séquence nucléotidique.

15 Ces séquences sont représentées à la figure 4 ainsi que dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe.

20 Cette séquence nucléotidique comporte une région 5' non traduite de 71 nucléotides suivie d'une séquence codante de 936 nucléotides et d'une séquence 3' non codante de 63 nucléotides. La séquence codante correspond à une protéine de 312 acides aminés d'un poids moléculaire attendu de 35 kilodaltons (protéine p35).

25 **VIII - La protéine p35 est largement conservée entre différentes espèces du parasite *Leishmania*.**

30 La protéine p35 est largement conservée entre différentes espèces du parasite *Leishmania* comme l'atteste les résultats de l'expérience d'hybridation moléculaire représentée à la figure 5.

35 En conséquence, la séquence nucléotidique codant pour la protéine p35 permet de définir, par hybridation dans des conditions de faible stringence, les acides nucléiques codant pour des protéines,

polypeptides et peptides présentant des homologies avec la protéine p35.

Les conditions d'hybridation de faible stringence indiquées ci-dessus sont par exemple les suivantes :

- traitement de pré-hybridation du support sur lequel on fixe l'acide nucléique représenté dans la SEQ ID NO:1 de la liste de séquences en annexe, à 42 °C, pendant 120 minutes avec une solution de pré-hybridation constituée de : formamide 50%, NaCl 900 mM, Na Citrate 90 mM, SDS 1%, ADN de thymus de veau 100 µg/ml, solution de Denhart 5X;

- hybridation avec l'acide nucléique complémentaire pendant 18 heures à 42 °C dans une solution constituée de : formamide 30%, NaCl 900 mM, Na Citrate 90 mM, SDS 1%, ADN de thymus de veau 100 µg/ml, solution de Denhart 5X, sulfate de dextran 40%;

- 3 lavages de 30 minutes à 37 °C avec une solution constituée de NaCl 300 mM, Na Citrate 30 mM, SDS 0,1 %.

La séquence nucléotidique codant pour la protéine p35, ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci, peut ainsi être utilisée comme sonde moléculaire pour le clonage de séquence homologue chez d'autres souches du parasite *Leishmania*. Par exemple, une sonde moléculaire préparée à partir de la séquence nucléique définie par la SEQ ID NO:1 peut être utilisée pour cribler une banque d'ADN complémentaire préparée à partir d'ARN de promastigotes de différentes souches de *leishmania* en utilisant des techniques bien connues de l'homme du métier (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D, Seideman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., *Currents Protocols in Molecular Biology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).

De même, des oligonucléotides appropriés s'hybridant avec la séquence nucléique codant pour la protéine p35, peuvent être utilisées dans des processus d'amplification par PCR pour le clonage de séquences nucléiques homologues d'autres souches du parasite *Leishmania* selon les techniques classiquement utilisées (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D, Seideman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., *Currents Protocols in Molecular Biology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).

IX - Production de la protéine p35 ou d'une partie de celle-ci.

La synthèse de la protéine p35 ou de formes tronquées de celle-ci peut être réalisée selon différentes techniques classiquement utilisées en microbiologie et en biologie moléculaire à partir de tout ou partie de la séquence nucléotidique codant pour la dite protéine.

1) La production d'un acide nucléique peut être réalisée par exemple par l'une des méthodes suivantes :

- Technique de PCR pour amplifier à partir d'ADN complémentaire de promastigotes du parasite *Leishmania major* un fragment d'ADN correspondant à tout ou partie de la séquence de la la SEQ ID NO:1 en annexe.

- Synthèse d'un oligonucléotide hybridant avec la séquence de la la SEQ ID NO:1 en annexe et utilisation pour le criblage d'une banque d'ADN complémentaire ou d'une banque génomique préparée à partir de la forme promastigote du parasite *Leishmania major*.

2) La synthèse de la protéine peut être réalisée par exemple par l'une des méthodes suivantes :

- Clonage de la séquence nucléotidique dans un vecteur d'expression procaryote (pET, pGST...),
5 production de la protéine recombinante et purification sur des colonnes d'affinité (Hochuli, E., 1989, vol. 12, pages 87-89, In "Genetic Engineering, Principle and Methods, J. K. Setlow Ed, Plenum Press, New York). Des techniques similaires ont été utilisées pour produire et
10 purifier différentes protéines recombinantes, par exemple l'aldolase du parasite *Plasmodium Falciparum* (Döbeli, H., Trecziak, A., Gillesen, D., Matile, H., Srivastava, I.K., Perrin, L.H., Jakob, P.E. & Certa, U., 1990 *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 41, pages 259-268) ou la transcriptase reverse du virus HIV
15 (Le Grice, S.F.J. & Gruenionger, -Leitch, F., 1990 *Eur. J. Biochem.*, vol. 187, pages 307-314).

- Clonage de la séquence nucléotidique dans un vecteur d'expression eucaryote (vecteur vaccine, bacculovirus, levure) et purification de la protéine
20 correspondante à partir du surnageant cellulaire et/ou d'extraits protéiques préparés après lyse des cellules. Une approche similaire a été utilisée dans de très nombreux cas, en particulier pour le clonage de gènes dans des vecteurs vaccines recombinants (Janknecht, R. &
25 de Martynoff, G., Lou, J., Hipkind, R.A., Nordheim, A. & Stunnenberg, H.G., 1991 *PNAS*, vol. 88, pages 8972-8976).

- Préparation de peptides et polypeptides synthétiques (Coligan, J.E., Kruisbeek, A., Margulies, D.H., Shevach, E.M., Srober, W., *Currents Protocols in Immunology* 1993, Greene, Editions Wiley - Interscience).
30

X - Conception de nouveaux vaccins à partir de la protéine p35.

5 Afin de déterminer si la protéine p35 ou une partie de celle-ci pouvait être utilisée comme vaccin pour protéger des souris de la souche BALB/c qui sont susceptibles à l'infection par le parasite *Leishmania major*, la protéine p24 a été produite en grande quantité (culture de 500 ml) à partir des bactéries du clone 10 23.12.10.33 et purifiée sur des colonnes d'affinité (résine Ni-NTA).

La protéine recombinante obtenue était pure à plus de 99% (analyse par électrophorèse à travers un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)).

15 En parallèle, une protéine recombinante contrôle (ovalbumine de poulet) a été produite et purifiée dans les mêmes conditions.

La protéine p24 ainsi que la protéine ovalbumine contrôle ont ensuite été administrées en 20 parallèle à des souris de la souche BALB/c selon un protocole décrit par Afonso, L.C.C. et al. (Afonso, L.C.C., Scharton, T.M., Vieira, L.Q., Wysocka, M., Trinchieri, G., Scott, P., 1993 *Science*, vol. 263, pages 235-237).

25 Des quantités variables de protéines recombinantes (entre 100 ng et 50 µg) ont été injectées dans les coussinets plantaires gauches de souris BALB/c âgées de 6 à 8 semaines en présence (1 µg) ou en absence d'interleukine-12. Dix jours plus tard, ces 30 mêmes souris ont reçu une injection intradermique de la protéine p24 ou de la protéine contrôle avec ou sans interleukine-12. Deux semaines plus tard, les souris ont été infectées par injection intradermique de 10⁵ promastigotes métacycliques du parasite *Leishmania major*. Dix semaines après l'infection, la moyenne des 35

lésions des souris immunisées avec la protéine p24 en présence d'interleukine-12 était de 0.2 mm alors que celles des souris immunisées avec la protéine recombinante contrôle en présence ou en absence d'interleukine-12 était de 4 mm. De même, la moyenne de la lésion des souris n'ayant reçu qu'une injection d'interleukine-12 était de 5 mm.

La protéine p35 représente le premier antigène immunodominant du parasite *Leishmania major* mis en évidence à ce jour

Les travaux ayant donné lieu à la présente invention permettent de produire cet antigène sous la forme d'une protéine recombinante par exemple dans *Escherichia coli* ce qui élimine les risques de contamination par d'autres protéines parasitaires. En outre, ces travaux offrent la possibilité de cloner le gène correspondant à tout ou partie de la protéine p35 dans des vecteurs pouvant être utilisés pour la vaccination de populations humaines ou animales (BCG, vecteur vaccine) et plus particulièrement :

- les populations humaines à risque dans les pays où la leishmaniose existe à l'état endémique comme le Soudan en Afrique centrale ou le Brésil en Amérique du Sud;

- les individus à risque dans les régions du monde occidental où l'on observe une recrudescence des cas survenant chez l'adulte (Alpes Maritimes en France);

- les animaux comme les chiens qui constituent des réservoirs du parasite dans des pays développés, en particulier dans le sud de la France, dans la région Provence-Côte d'Azur.

LISTE DE SEQUENCESINFORMATION POUR LA SEQ ID NO : 1 :

- 5 CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE
- A) LONGUEUR : 1070 paires de bases et 312 acide aminés
 B) TYPE : acide nucléique et protéine correspondante
 C) NOMBRE DE BRIN : ADN double brin
 D) CONFIGURATION : linéaire
- 10 TYPE DE MOLECULE : ADNc
- HYPOTHETIQUE : non
- ANTI-SENS : non
- ORIGINE
- 15 A) ORGANISME : Leishmania major
 B) SOUCHE : Wordl Health Organisation strain WHOM/IR/-/1
 D) STADE DE DEVELOPPEMENT : promastigote
- CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE
- 20 A) NOM/CLE : protéine p35
 B) EMPLACEMENT : - de l'acide aminé 1
 - à l'acide aminé 312
- D) AUTRES INFORMATIONS IMPORTANTES : séquence codante pour la protéine p35
 - du nucléotide 72
 - au nucléotide 1010
- CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE
- 25 A) NOM/CLE : protéine p24
 B) EMPLACEMENT : - de l'acide aminé 142
 - à l'acide aminé 312
- D) AUTRES INFORMATIONS IMPORTANTES : séquence codante pour la protéine p24
 - du nucléotide 495
 - au nucléotide 1010
- 30 CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE
- A) NOM/CLE : peptide de la protéine p24
 B) EMPLACEMENT : - de l'acide aminé 156
 - à l'acide aminé 169

35 DESCRIPTION DE SEQUENCE : SEQ ID NO : 1 :

| | | |
|----|--|-----|
| | AACTAACGCT ATATAAGTAT CAGTTTCTGT ACTTTATTGA TAAGTTTCTT CTCACTCCAC | 60 |
| 40 | TTCGTTTCAC C ATG AAC TAC GAG GGT CAC CTG AAG GGT CAC CGA GGA TGG Met Asn Tyr Glu Gly His Leu Lys Gly His Arg Gly Trp 1 5 10 | 110 |
| 45 | GTC ACC TCC CTG GCC TGC CCG CAG CAG GCG GGG TCG TAC ATC AAG GTG Val Thr Ser Leu Ala Cys Pro Gln Gln Ala Gly Ser Tyr Ile Lys Val 15 20 25 | 158 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|
| | | GTG Val 30 | TCG Ser | ACG Thr | TCG Ser | CGC Arg | GAT Asp 35 | GGT Gly | ACG Thr | GTC Val | ATC Ile | TCG Ser 40 | TGG Trp | AAG Lys | GCC Ala | AAC Asn | CCC Pro 45 | 206 |
| 5 | | GAC Asp | CGC Arg | CAC His | AGC Ser 50 | TGG Trp | ACA Thr | GCG Ala | ACT Thr | ACG Thr | GTC Val 55 | TGT Cys | CGA Arg | ACC Thr | ACC Thr | GCC Ala 60 | TCG Ser | 254 |
| | | AGG Arg | GGC Gly | ACA Thr | CCG Pro 65 | GCT Ala | TCG Ser | TGT Cys | CGT Arg | GCG Ala 70 | TGT Cys | CGC Arg | TGG Trp | GCC Ala | ACG Thr 75 | CCA Pro | CCG Pro | 302 |
| 10 | | TAC Tyr | TAC Tyr | GCG Ala 80 | CTG Leu | ACC Thr | GTG Val | TCC Ser | TGG Trp 85 | GAC Asp | CGC Arg | TCC Ser | ATC Ile | CGT Arg 90 | ATG Met | TGG Trp | GAC Asp | 350 |
| 15 | | CTG Leu | CGC Arg 95 | ATT Ile | GGA Gly | CAG Gln | TGC Cys | CAG Gln 100 | CGC Arg | AAG Lys | TTC Phe | CTG Leu 105 | AAG Lys | CAC His | ACC Thr | AAG Lys | GAC Asp | 398 |
| 20 | | GTG Val 110 | CTC Leu | ACC Thr | GTC Val | GCC Ala | TTC Phe 115 | TCA Ser | CCG Pro | GAC Asp | GAC Asp | CGC Arg 120 | CTG Leu | ATC Ile | GTG Val | TCC Ser | GCG Ala 125 | 446 |
| | | GGC Gly | CGC Arg | GAC Asp | AAC Asn 130 | GTG Val | ATC Ile | CGC Arg | GTG Val | TGG Trp | AAC Asn 135 | GTG Val | GCG Ala | GGT Gly | GAG Glu | TGC Cys 140 | ATG Met | 494 |
| | | CAC His | GAG Glu | TTC Phe | CTG Leu 145 | CGC Arg | GAC Asp | GGT Gly | CAC His | GAG Glu 150 | GAC Asp | TGG Trp | GTG Val | AGC Ser | AGC Ser 155 | ATC Ile | TGC Cys | 542 |
| 30 | | TTC Phe | TCG Ser | CCG Pro 160 | TCG Ser | CTG Leu | GAG Glu | CAC His | CCG Pro 165 | ATC Ile | GTG Val | GTG Val | TCC Ser | GGC Gly 170 | AGC Ser | TGG Trp | GAC Asp | 590 |
| 35 | | AAC Asn 175 | ACC Thr | ATC Ile | AAA Lys | GTA Val | TGG Trp | AAC Asn 180 | GTG Val | AAC Asn | GGG Gly | GGC Gly | AAG Lys 185 | TGT Cys | GAG Glu | CGC Arg | ACG Thr | 638 |
| 40 | | CTC Leu 190 | AAG Lys | GGC Gly | CAC His | AGT Ser | AAC Asn 195 | TAC Tyr | GTG Val | TCC Ser | ACG Thr | GTG Val 200 | ACG Thr | GTG Val | TCG Ser | CCA Pro | GAC Asp 205 | 686 |
| | | GGG Gly | TCT Ser | CTG Leu | TGC Cys | GCA Ala 210 | TCT Ser | TGC Cys | GGC Gly | AAG Lys | GAC Asp 215 | GGC Gly | GCG Ala | GTG Val | CTG Leu | TTG Leu 220 | TGG Trp | 734 |
| | | GAC Asp | CTG Leu | AGC Ser | ACC Thr 225 | GGT Gly | GAG Glu | CAG Gln | CTG Leu | TTC Phe 230 | AAG Lys | ATC Ile | AAC Asn | GTG Val | GAG Glu 235 | TCG Ser | GCC Ala | 782 |
| 50 | | ATC Ile | AAC Asn | CAG Gln 240 | ATC Ile | GGC Gly | TTC Phe | TCG Ser | CCC Pro 245 | AAC Asn | CGC Arg | TTC Phe | TGG Trp | ATG Met 250 | TGC Cys | GTC Val | GCG Ala | 830 |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | |
|----|---|------|
| | ACG GAG AGG TCT CTG TCC GTG TAC GAC CTG GAG AGC AAG GCC GTG ATT | 878 |
| | Thr Glu Arg Ser Leu Ser Val Tyr Asp Leu Glu Ser Lys Ala Val Ile | |
| | 255 260 265 | |
| 5 | GCG GAG CTG ACG CCG GAC GGC GCG AAG CCG TCG GAG TGC ATC TCC ATT | 926 |
| | Ala Glu Leu Thr Pro Asp Gly Ala Lys Pro Ser Glu Cys Ile Ser Ile | |
| | 270 275 280 285 | |
| 10 | GCC TGG TCC GCC GAC GGC AAC ACT CTG TAC TCC GGC CAC AAG GAC AAC | 974 |
| | Ala Trp Ser Ala Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Ser Gly His Lys Asp Asn | |
| | 290 295 300 | |
| 15 | CTG ATC CGC GTG TGG TCC ATC TCC GAC GCC GAG TAA TGGCCGCGCG | 1020 |
| | Leu Ile Arg Val Trp Ser Ile Ser Asp Ala Glu * | |
| | 305 310 | |
| | CTGCTCGTGC CGGACGGCGT GGTAGGCGAG GGAGAACGAG CGAGAAGTGA | 1070 |
| 20 | | |

REVENDEICATIONS

- 1) Protéine caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence de 312 acides aminés représentée dans la SEQ ID NO:1 en annexe, ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci dès lors qu'elle est reconnue par un anticorps anti-p35.
- 2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'au moins 10 acides aminés consécutifs dans la SEQ ID NO:1 en annexe, ou une forme modifiée de celle-ci possédant au moins 40 % d'homologie avec ladite séquence.
- 3) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 143 et 312 dans la SEQ ID NO:1 en annexe, ou une forme modifiée de celle-ci possédant au moins 40 % d'homologie avec ladite séquence.
- 4) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce qu'elle comprend ou est constituée par la séquence peptidique de 18 acides aminés délimitée par les acides aminés situés aux positions 156 et 173 dans la SEQ ID NO:1 en annexe, ou une forme modifiée de celle-ci possédant au moins 40 % d'homologie avec ladite séquence.
- 5) Conjugué présentant des propriétés antigéniques, caractérisé en ce qu'il est constitué par une protéine selon l'une des revendication 1 à 4 couplé à une molécule porteuse.

6) Anticorps notamment monoclonal dirigé contre au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou un conjugué selon la revendication 5.

5

7) Acide nucléique codant pour une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

8) Acide nucléique selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique représentée dans la SEQ ID NO:1 en annexe, ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci dès lors qu'elle est capable de s'hybrider avec ladite séquence ou avec son complémentaire.

15

9) Acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 72 et 1010 dans la SEQ ID NO:1 en annexe, ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci dès lors qu'elle est capable de s'hybrider avec ladite séquence ou avec son complémentaire.

20

10) Acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 498 et 1010 dans la SEQ ID NO:1 en annexe, ou une forme modifiée ou une partie de celle-ci dès lors qu'elle est capable de s'hybrider avec ladite séquence ou avec son complémentaire.

25

30

11) Sonde nucléotidique constituée d'un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 ou de son complémentaire, éventuellement marqué.

35

12) Acide nucléique recombinant caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 associé avec un promoteur et/ou un terminateur de transcription reconnu par les enzymes de la cellule hôte dans laquelle ledit acide nucléique recombinant est introduit.

13) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comporte un insert d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 7 à 10.

14) Cellule eucaryote ou procaryote caractérisée en ce qu'elle incorpore un acide nucléique recombinant selon la revendication 12 ou un vecteur recombinant selon la revendication 13.

15) Virus recombinant caractérisé en ce qu'il incorpore un acide nucléique recombinant selon la revendication 12.

16) Composition antigénique comprenant à titre d'agent actif au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et/ou un conjugué selon la revendication 5.

17) Méthode de dépistage *in vitro* de la leishmaniose caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'au moins un anticorps selon la revendication 6 avec un prélèvement biologique d'un sujet susceptible d'être infecté par un parasite responsable de leishmaniose, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre ledit anticorps et les protéines antigéniques contenus dans le prélèvement;

- la détection dudit complexe par tout moyen approprié.

5 18) Trousse de diagnostic pour la mise en oeuvre de la méthode selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'elle comprend :

- une quantité déterminée d'au moins un anticorps selon la revendication 6,
- 10 - un milieu approprié à la formation de complexes immunologiques avec ledit anticorps,
- des réactifs permettant la détection des complexes éventuellement formés,
- éventuellement des échantillons témoins.

15 19) Méthode de dépistage *in vitro* de la leishmaniose caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou d'un conjugué selon la revendication 5 ou d'une composition antigénique selon la revendication 16, avec un prélevement biologique d'un sujet susceptible d'être infecté par un parasite responsable de leishmaniose, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre ladite protéine ou composition antigénique et les anticorps anti-p35 éventuellement présents dans le prélevement analysé,
- 25 - la détection dudit complexe par tout moyen approprié.

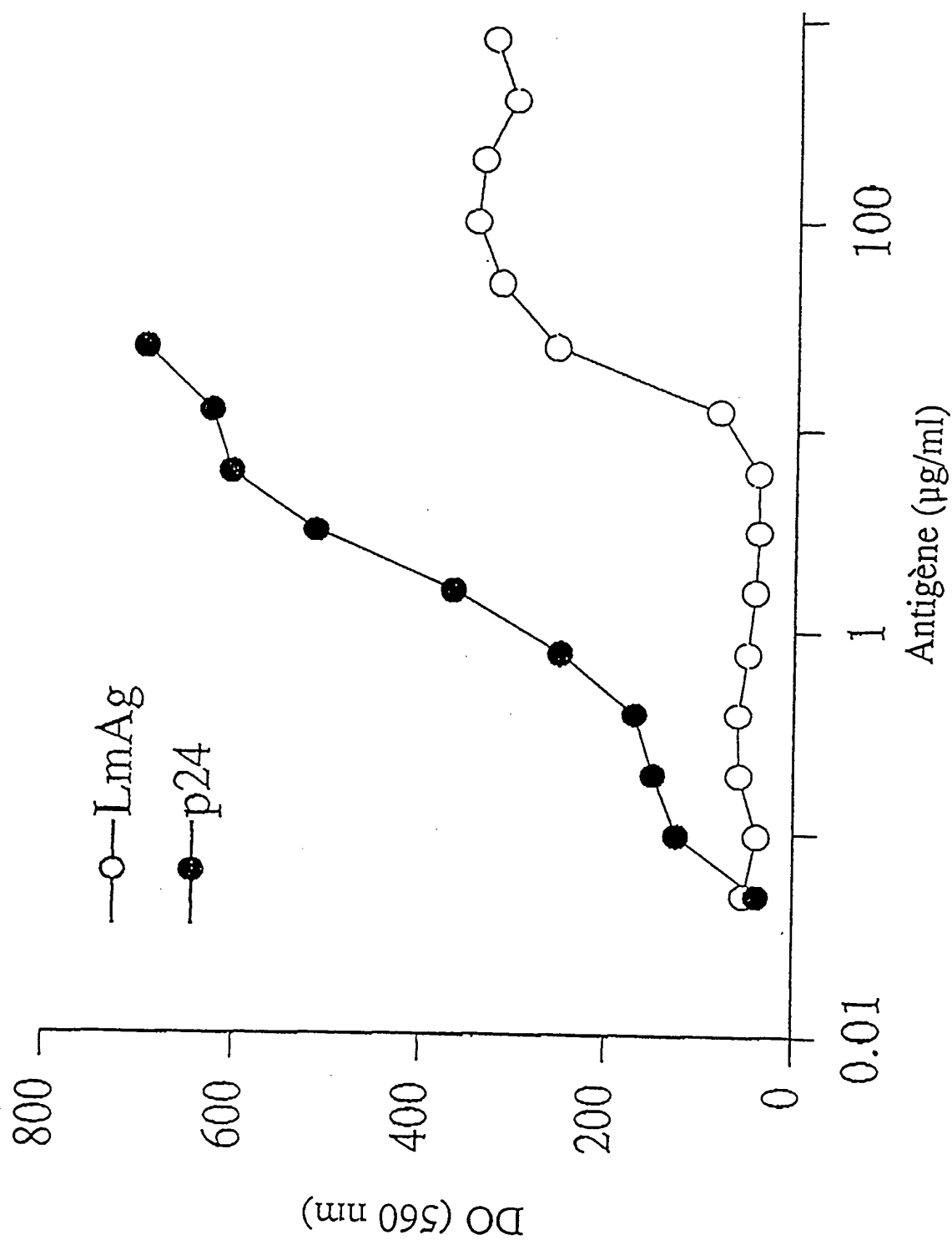
30 20) Trousse de diagnostic pour la mise en oeuvre de la méthode selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle comprend :

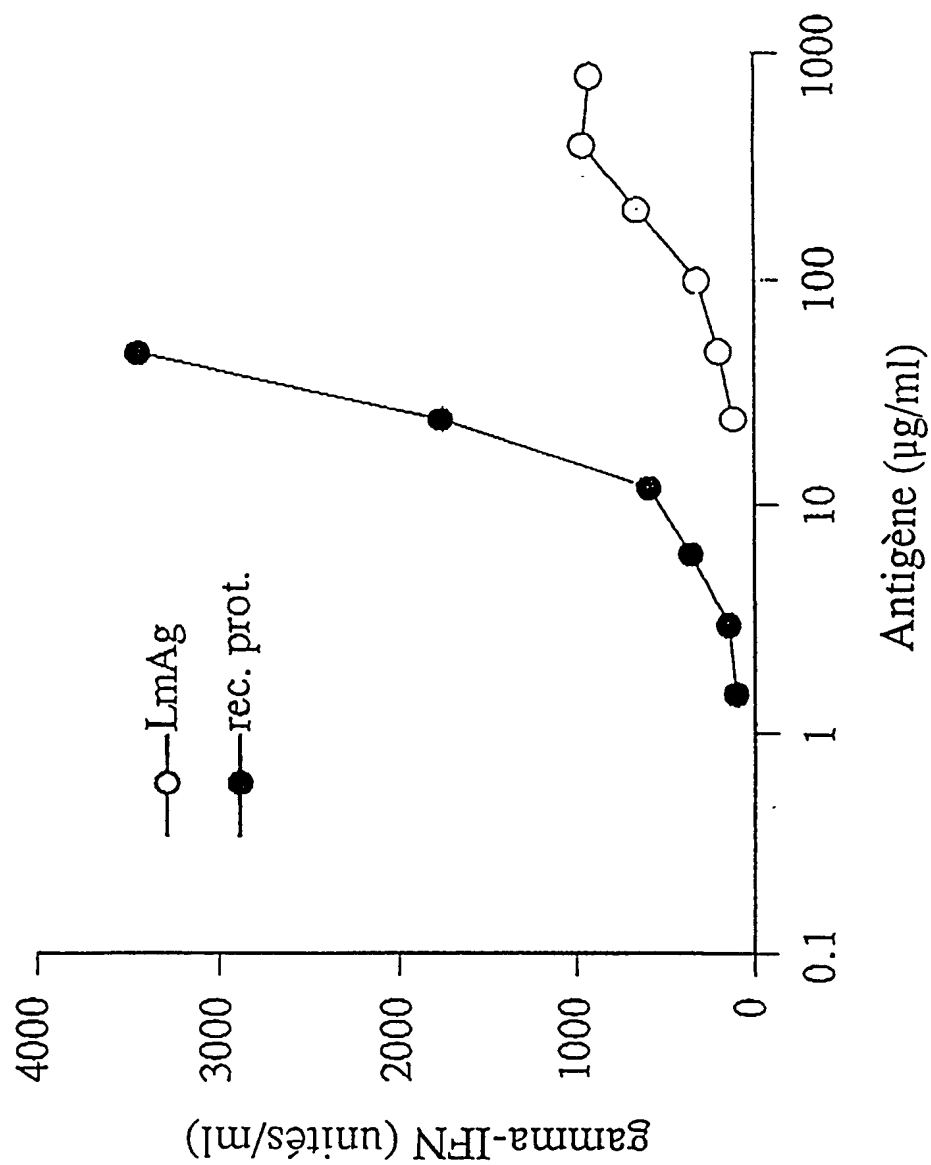
- une quantité déterminée d'au moins une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4

ou d'un conjugué selon la revendication 5 ou d'une composition antigénique selon la revendication 16,

- un milieu approprié à la formation de complexes immunologiques avec ladite protéine ou ladite composition antigénique,
- des réactifs permettant la détection des complexes éventuellement formés,
- éventuellement des échantillons témoins.

- 21) Composition pharmaceutique utile comme vaccin chez l'homme ou l'animal contre la leishmaniose, caractérisée en ce qu'elle comporte à titre d'agent actif au moins une protéine selon l'une des revendications 1 à 4 ou un virus recombinant vivant éventuellement dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

PL.1/5Fig. 1

PL.2/5Fig. 2

PL.3/5Fig. 3

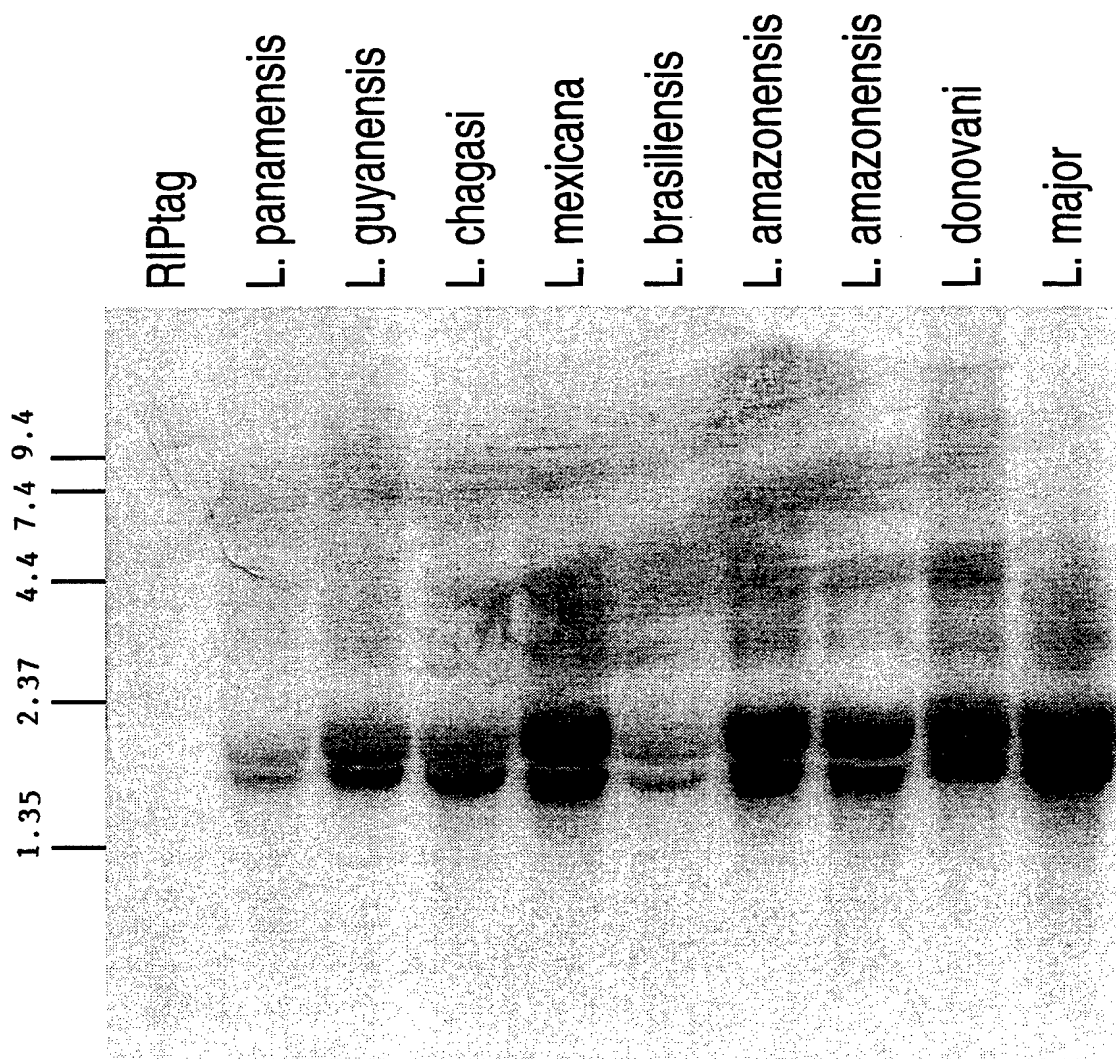
20 * * * * * 40 * * * * * 60 * * * * * 80 * * * * *
 ATG GCT ACC ATG ACT GGT GCA CAG CAA ATG GGT GCA TCT CAT ATC ATC CAT TAC CCA TAC CAT GTT CCA CAT TAC CCT ACC TTG GGT GGT GAA
 Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser Asp Ile Ile Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Gly Pro Glu>
 100 * * * * * 120 * * * * * 140 * * * * * 160 * * * * * 180 * * * * *
 TTG ACC CAC CAT CAC CAC CAC GGC GAA TTC CAG CAG TTC CTG GGC GAC GGT CAC CAG CAG TGG CTG ACC ACC ATC TTC TTC TCG CCG TCG CTG CAG
 Leu Ser His His His His His Gly Glu Phe Glu Glu Phe Leu Arg Asp Gly His Glu Asp Trp Val Ser Ser Ile Cys Phe Ser Pro Ser Leu Glu>
 200 * * * * * 220 * * * * * 240 * * * * * 260 * * * * * 280 * * * * *
 CAC CCG ATC GTG GTG TCC GGC ACC TGG CAC AAC ACC ATC AAA GTA TGG AAC GTC AAC GCG CCC ANG TCT GAG CCC ACG CTC AAG GGC CAC AGT AAC TAC
 His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp Asn Thr Ile Lys Val Trp Asn Val Asn Gly Gly Lys Cys Glu Arg Thr Leu Lys Gly His Ser Asn Tyr>
 300 * * * * * 320 * * * * * 340 * * * * * 360 * * * * * 380 * * * * *
 GTG TCC ACG GTG ACG GTG TGG CCA CAC GCG TCT CTG TCC CCA TCT TCC GGC AAG CAC CAC GCG GTC GTG CTG TTG TGG CAC CTG ACC ACC GGT CAG CAG CTG
 Val Ser Thr Val Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu Cys Ala Ser Cys Gly Lys Asp Gly Ala Val Leu Leu Trp Asp Leu Ser Thr Gly Glu Gln Leu>
 400 * * * * * 420 * * * * * 440 * * * * * 460 * * * * * 480 * * * * *
 TTC AAG ATC AAC GTG CAG TGG GGC ATC AAC CAG ATC GGC TTC TCG CCC AAC CCG TTC TGG ATG TCC GTC CCG ACG CAG ACG TCT CTG TCC GTC TAC CAC
 Phe Lys Ile Asn Val Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ile Gly Phe Ser Pro Asn Arg Phe Trp Met Cys Val Ala Thr Glu Arg Ser Leu Ser Val Tyr Asp>
 500 * * * * * 520 * * * * * 540 * * * * * 560 * * * * * 580 * * * * *
 CTG CAG ACG AAG CCC GTG ATT GCG CAG CTG ACG CCG CAC CCG AAC CCG TCG CAG TCC ATC TCC ATT CCG TCG TCC CCG CAC GGC AAC ACT CTG TAC
 Leu Glu Ser Lys Ala Val Ile Ala Glu Leu Thr Pro Asp Gly Ala Lys Pro Ser Glu Cys Ile Ser Ile Ala Trp Ser Ala Asp Gly Asn Thr Leu Tyr>
 600 * * * * * 620 * * * * * 640 * * * * * 660 * * * * * 680 * * * * *
 TCC CCG CAC AAG CAC AAC CTG ATC CCG GTG TGG TCC ATC TCC CAC CCG CAG TAA TGG CCG CCG GGT GGT GGT CCG CCA CCG CCG GGT AGG CCA GCG ACA
 Ser Gly His Lys Asp Asn Leu Ile Arg Val Trp Ser Ile Ser Asp Ala Glu *** Trp Pro Arg Ala Ala Arg Ala Gly Arg Arg Gly Arg Gly Arg>
 700 * * * * *
 ACG ACC CAG AAG TCA
 Thr Ser Glu Lys ***>

PL.4/5Fig. 4

AACTAAGCGCTATATAGATATCAGTTTCCTGTTCTTATTCGATTAAGTTTCTTCACCTCCACTTCGTTTCACG
 80 * 100 * 120 * 140 * 160 *
 ATG AAC GAG GGT CAC CTC AAG GGT CAC CCA GGA TGG GTT ACC TTC CGC GCG CAG CAG GCG TGG TAC ATC AAG GTG TGG ACG TCG
 Met Asn Tyr Glu Gly Thr Leu Lys His Arg Gly Trp Val Thr Ser Leu Ala Cys Pro Gln Gln Ala Gly Ser Tyr Ile Lys Val Val Ser Thr Ser>
 180 * 200 * 220 * 240 * 260 *
 CGC GAT GGT ACG GTC ATC TCG TGG AAG GCC AAC CCC GAC CGC CAC AGC TGG ACA GCG ACT ACG GTC TGT CGA ACC ACC GCG TCG AGG GCG ACA CCG GCT
 Arg Asp Gly Thr Val Ile Ser Trp Lys Ala Asn Pro Asp Arg His Ser Trp Thr Ala Thr Thr Val Cys Arg Thr Thr Ala Ser Arg Gly Thr Pro Ala>
 280 * 300 * 320 * 340 * 360 *
 TCG TGT CGT GGT TGT CGC TGG ACC CCG TAC TAC CCG CCG CTC ACC GTC TCC TCG GAC CGC TCC ATC CGT ATG TGG GAC CTG CGC ATT GGA CAG TGC
 Ser Cys Arg Ala Cys Arg Trp Ala Thr Pro Pro Tyr Tyr Ala Leu Thr Val Ser Trp Asp Arg Ser Ile Arg Met Trp Asp Leu Arg Ile Gly Gln Cys>
 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *
 CAG CCG AAG TTC CTG AAG CAC ACC AAG CAC GTG CTC ACC GTC GCC TTC TCA CCG GAC GAC CGC CTG ATC GTG TCC CGC GCG GAC AAC GTG ATC CCG
 Gln Arg Lys Phe Leu Lys His Thr Lys Asp Val Leu Thr Val Ala Phe Ser Pro Asp Asp Arg Leu Ile Val Ser Ala Gly Arg Asp Asn Val Ile Arg>
 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *
 GTG TGG AAC GTG GCG GGT GAG TCC ATG CAC GAG TTC CTG GCG GAC GGT CAC GAG GAC TGG GTG AGC AGC ATC TGC TTC TCG CCG TCG CTG GAG CAC CCG
 Val Trp Asn Val Ala Gly Glu Cys Met His Glu Phe Leu Arg Asp Gly His Glu Asp Trp Val Ser Ile Cys Phe Ser Pro Ser Leu Glu His Pro>
 580 * 600 * 620 * 640 * 660 *
 ATC GTG GTG TCC GCG AGC TGG CAC AAC ACC ATC AAT GTA TGG AAC GTG AAC GCG GGC AAG TGT GAG CGC ACG CTC AAG GCG CAC AGT AAC TAC GTG TCC
 Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp Asn Thr Ile Lys Val Trp Asn Val Asn Gly Gly Lys Cys Glu Arg Thr Leu Lys Gly His Ser Asn Tyr Val Ser>
 680 * 700 * 720 * 740 * 760 *
 ACG GTG ACG GTG TCG CCA GAC GCG TCT CTG TGC GCA TCT TGC GGC AAG GAC GCG GCG GTG CTG TTG TGG GAC CTG AGC ACC GGT GAG CAG CTG TTC AAG
 Thr Val Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu Cys Ala Ser Cys Gly Lys Asp Gly Ala Val Leu Leu Trp Asp Leu Ser Thr Gly Glu Gln Leu Phe Lys>
 780 * 800 * 820 * 840 * 860 *
 ATC AAC GTG GAG TCG GCC ATC AAC CAG ATC GCG TTC TCG CCC AAC CCG TTC TGG ATG TGC GTC GCG ACG GAG AGG TCT CTG TCC GTG TAC GAC CTG GAG
 Ile Asn Val Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ile Gly Phe Ser Pro Asn Arg Phe Trp Met Cys Val Ala Thr Glu Arg Ser Leu Ser Val Tyr Asp Leu Glu>
 880 * 900 * 920 * 940 * 960 *
 AGC AAG GCC GTG ATT GCG GAG CTG ACG CCG GAC GCG CCG AAG CCG CTG TCG GAG TGC ATC TCC ATT GCC TGG TCC GCG GAC GCG AAC ACT CTG TAC TCC GCG
 Ser Lys Ala Val Ile Ala Glu Leu Thr Pro Asp Gly Ala Lys Pro Ser Glu Cys Ile Ser Ile Ala Trp Ser Ala Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Ser Gly>
 980 * 1000 *
 CAC AAG GAC AAC CAG CTG ATC CCG GTG TGG TCC ATC TCC GAC GCC GAG TAA TGGCGCGCGCTCTCTCTGTCGCGACCGCGCTGATAGCGAGGAGACGACGAGAGTGA
 His Lys Asp Asn Leu Ile Arg Val Trp Ser Ile Ser Asp Ala Glu ***>

PL. 5/5

Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00529

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/44 C07K16/20 C12N5/10
C12Q1/68 C12N7/01 A61K39/008 A61K39/395 A61K35/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol. 144, no. 3, 1 February 1990 BALTIMORE US, pages 1075-1079, PHILLIP SCOTT ET AL. 'Protection against Leishamnia major in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes' cited in the application see abstract see page 1075, right column, paragraph 2 - paragraph 3 see page 1078, right column, paragraph 3 - page 1079, left column, paragraph 3 --- -/-- | 1,21 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 August 1995

Date of mailing of the international search report

30.08.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00529

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|------------------------------------|
| A | <p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 60, no. 4, April 1992 WASHINGTON US, pages 1368-1374, ARVE OSLAND ET AL. 'Isolation and characterization of recombinant antigens from Leishmania aethiopica that react with human antibodies' see abstract see page 1373, left column, last paragraph - right column, paragraph 1 ---</p> | <p>1,6,7, 13,16, 19-21</p> |
| A | <p>FR-A-2 615 103 (INSTITUT PASTEUR) 18 November 1988 see page 2, line 10 - line 20 page 3, table I -----</p> | <p>1,5,16, 19-21</p> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00529

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| FR-A-2615103 | 18-11-88 | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema: internationale No
PCT/FR 95/00529

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N15/30 C12N15/86 C07K14/44 C07K16/20 C12N5/10
 C12Q1/68 C12N7/01 A61K39/008 A61K39/395 A61K35/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N C12Q A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| A | <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol. 144, no. 3, 1 Février 1990 BALTIMORE US, pages 1075-1079, PHILLIP SCOTT ET AL. 'Protection against Leishmania major in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes' cité dans la demande voir abrégé voir page 1075, colonne de droite, alinéa 2 - alinéa 3 voir page 1078, colonne de droite, alinéa 3 - page 1079, colonne de gauche, alinéa 3 --- -/--</p> | 1,21 |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 Août 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

3 0. 08. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema internationale No
PCT/FR 95/00529

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|--|------------------------------------|
| A | <p>INFECTION AND IMMUNITY, vol. 60, no. 4, Avril 1992 WASHINGTON US, pages 1368-1374, ARVE OSLAND ET AL. 'Isolation and characterization of recombinant antigens from Leishmania aethopica that react with human antibodies' voir abrégé voir page 1373, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 ---</p> | <p>1,6,7, 13,16, 19-21</p> |
| A | <p>FR-A-2 615 103 (INSTITUT PASTEUR) 18 Novembre 1988 voir page 2, ligne 10 - ligne 20 * page 3, tableau I * -----</p> | <p>1,5,16, 19-21</p> |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema. internationale No

PCT/FR 95/00529

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| FR-A-2615103 | 18-11-88 | AUCUN | |